

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

CLIPPEDIMAGE= JP362025991A

PAT-NO: JP362025991A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 62025991 A

TITLE: METHOD OF SEPARATING AND PURIFYING BERBERINE ALKALOID

PUBN-DATE: February 3, 1987

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

MOTOYAMA, YOSHIO

KIHARA, NORIAKI

ISHIDA, TATSUKAZU

KATOU, KOUJI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

SEITAI KINOU RIYOU KAGAKUHN SHINSEIZOU N/A

GIJUTSU KENKYU KUMIAI

APPL-NO: JP60164061

APPL-DATE: July 26, 1985

INT-CL (IPC): C12P017/18; C07D455/03

US-CL-CURRENT: 435/119,435/948

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain in high purity berberine alkaloid, by treating tissue piece or cell of a plant with a specific alcohol to give an extracted solution, adding a specific salt exchanger to the solution to precipitate berberine alkaloid as a salt and separating berberine alkaloid.

CONSTITUTION: Tissue piece of cell containing berberine alkaloid is treated with 2~4C aliphatic alcohol, the prepared extracted solution is incorporated with a salt exchanger containing chlorine ion and/or nitrate ion to precipitate berberine alkaloid as a salt, which is separated.

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-25991

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)2月3日

C 12 P 17/18

C 07 D 455/03

// (C 12 P 17/18

C 12 R 1:91)

C-7732-4B

6664-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ベルベリンアルカロイドの分離精製法

⑮ 特 願 昭60-164061

⑯ 出 願 昭60(1985)7月26日

⑰ 発 明 者 元 山 吉 夫 山口県玖珂郡和木町和木二丁目4番10号  
 ⑰ 発 明 者 木 原 則 昭 山口県玖珂郡和木町和木二丁目11番3号  
 ⑰ 発 明 者 石 田 達 麗 大竹市御園1丁目2番7号  
 ⑰ 発 明 者 加 藤 穂 慈 山口県玖珂郡和木町和木二丁目4番9号  
 ⑱ 出 願 人 生体機能利用化学品新 東京都中央区日本橋茅場町一丁目13番21号  
 製造技術研究組合  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 山 口 和

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ベルベリンアルカロイドの分離精製法

## 2. 特許請求の範囲

- (I) ベルベリンアルカロイドを含有する植物の組織片又は細胞を炭素数2ないし4の脂肪族アルコールで処理して得られる抽出液に、塩素イオン又は／および硝酸イオンを含む塩交換剤を加えてベルベリンアルカロイドを該イオンの塩として析出させてこれを分離することを特徴とするベルベリンアルカロイドの分離精製法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はベルベリンアルカロイド含有物からベルベリンアルカロイドを分離精製する方法に関する。ベルベリンアルカロイドは強弱、細菌性腸疾患治療剤、黄色系の染料などとして需要のある化合物である。

## 〔従来の技術〕

ベルベリンアルカロイド含有物からベルベリンアルカロイドを分離する従来の方法に関しては、ベルベリンアルカロイドを生産する植物、例えばミカン科に属する黄柏、キンボウゲ科に属するオウレン等の植物の組織あるいは該組織を組織培養することによつて得られるカルスを原料としてこれよりベルベリンを分離精製する方法がいくつか報告されている。

例えば、特開昭47-30897号公報には組織培養によつて得たカルスを粉碎してこれをメタノールで抽出し、該抽出物を濃縮後これに塩酸を加えて酸性にしてからエーテル抽出を行い、エーテル不溶部をアンモニアでアルカリ性としてからクロロホルムで抽出しこのクロロホルム可溶部を濃縮したものを薄層クロマトグラフィー(T.L.C.)にかけてベルベリンを分取する方法が開示されている。

また、特開昭50-13519号公報及び特開昭51-12993号公報には、組織培養によつて得られた黄柏カルスを粉碎してこれを熱水あるいはメタノール

ルで抽出し、この抽出液を減圧濃縮した後、塩酸で酸性としてメタノールを溶出剤としてアルミナを用いたカラムクロマトグラフィーにかけて夾雑物を除き、得られたベルベリン含有メタノール溶液に熱水を加えて均一にしてから冷却することにより塩化ベルベリンを析出分離する方法が開示されている。

また特開昭55-155056号公報にはキハダの粉砕物に95%エタノールを加えて加温抽出を行い、次にこの抽出液を濃縮後これに水とタルクを加えて加温抽出を行つてから濾過することにより不純物を除去して、ベルベリンを含有した色素抽出液を得る方法が開示されている。該方法はベルベリン抽出液を得る方法であつて、ベルベリンを単離する方法については該公報には何も示されていない。

また特開昭57-144992号公報にはツツラフジ科植物の組織培養によつて得られた培養物からジャトロリジン、パルマチンのベルベリンアルカロイドを分離する方法が開示されている。該方法によれば培養物は培養細胞と培養液に遊離された後、

風乾した培養細胞をエタノールで抽出し、一方培養液はアルカリ性にしてからクロロホルムで抽出され、次にそれぞれの抽出物を濃縮した後、これを薄層クロマトグラフィー(T.L.C.)で展開して目的成分を含むスポットを分画し、これを水溶液にしてからヨウ化カリウムを加えてヨード塩として沈澱させて目的のベルベリンアルカロイドを分離する方法が示されている。

以上示した従来のベルベリンアルカロイドの分離精製法はいずれも操作工程が非常に多く複雑であり、しかも得ようとするベルベリンアルカロイドの回収効率が低く、効率が悪い上に更に抽出時に不純物である各種の脂肪酸エステルが随伴されるので後でこれをエーテル処理によつて脱脂処理する必要があるなど欠点を有する。

前記方法とは異なる新しい分離方法として本出願人は、特開昭59-82951号によつて、アキカラムツの組織培養によつて得られる培養細胞と培養液からなる培養混合物、あるいは培養細胞から培養液中に放出されたベルベリンアルカロイドを含む

3

培養液に塩素イオンまたは硝酸イオンを添加してベルベリンアルカロイドを難溶性の黄色結晶として析出させ、これを単離し、必要に応じて再結晶してベルベリンアルカロイドを分離精製する方法を示した。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者等はベルベリンアルカロイドの分離精製に関する従来の方法について検討した所、特開昭59-82951号を除く他の方法はいずれも前述したように操作工程が多く複雑で回収効率が低いなど種々の欠点を有していることを認めた。一方特開昭59-82951号の方法は、培養中に培養細胞から液体培地中に放出されてこれに溶解したベルベリンアルカロイド含有水溶液、あるいは培養細胞を破壊処理してベルベリンアルカロイドを細胞外へ抽出したベルベリンアルカロイド含有水溶液を原料として、これに塩素イオン又は硝酸イオンを添加してベルベリンアルカロイドを析出させる方法であるが、更に一層の改良が望まれる。例えば培養細胞を必ずしも機械的に破壊処理しなくても良く、

4

又分離されたベルベリンアルカロイドの純度を高くできる方法が望まれる。

こういった背景のもとに本発明者等は従来法とは違つて、工程数の少ない簡単な方法によつて、しかも高い回収率でもつてベルベリンアルカロイドを高純度で、ベルベリンアルカロイド含有物から分離精製する方法について鋭意検討した。

(問題点を解決するための手段と作用)

その結果、下記方法を採用すれば前記目的を達成できることを見出し本発明を完成するに至つた。

すなわち、本発明の方法によれば、ベルベリンアルカロイドを含有する植物の組織片又は細胞を炭素数2ないし4の脂肪族アルコールで処理して得られる抽出液に、塩素イオン又は/および硝酸イオンを含む塩交換剤を加えてベルベリンアルカロイドを該イオンの塩として析出させてこれを分離することを特徴とするベルベリンアルカロイドの分離精製法、が提供される。

本発明のベルベリンアルカロイドの分離精製法において原料として用いられるベルベリンアルカ

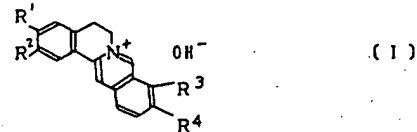
5

6

ロイドを含有する植物の組織片又は細胞として具体的にはオウレン、アキカラマツ等のキンポウゲ科植物、キハダ等のミカン科植物、ツツラフジ科植物などのベルベリンアルカロイド生産性植物の組織片あるいは該植物組織片の組織培養によつて得られる培養細胞（カルスも含める）である。培養細胞は通常は培養細胞と培地の混合物となつてゐるので、例えば培地として液体培地を用いた場合には培養混合物は必要に応じて培養細胞と培養液に分けられる。ベルベリンアルカロイドを含む培養細胞は湿潤の状態であるいは風乾等によつて乾燥させて、本発明の特定の脂肪族アルコールによる次の抽出操作の原料として用いることができる。一方、培養液には培養細胞からベルベリンアルカロイドが細胞外へ一部放出されている場合があるが、この場合には、例えば培養混合物の全体を適宜の程度に濃縮乾固したものを後述する特定の脂肪族アルコールによる抽出の原料として使用しても良い。あるいはこの場合には培養液に対しては本発明の方法とは別に、先に示した本出願人

に係わる特願昭59-82951号の方法によつて、すなわちベルベリンアルカロイドを溶出した培養液を培養混合物から培養細胞を除いて得、次に該培養液に塩素イオンまたは硝酸イオンを加えてベルベリンアルカロイドを難溶性の黄色結晶として析出させて分離することも出来る。他方培養細胞に対しては前記した本発明の方法によつて処理される。

本発明の方法によつて分離精製されるベルベリンアルカロイドとして具体的には式(1)



で示されるベルベリン ( $R_1, R_2 = -OCH_2O-$ 、 $R_3, R_4 = -OCH_3$ )、パルマチン ( $R_1, R_2, R_3, R_4 = -OCH_3$ )、コプティシン ( $R_1, R_2 = -OCH_2O-$ 、 $R_3, R_4 = -OCH_2O-$ )、ジャトロリジン ( $R_1 = -OH$ 、 $R_2, R_3, R_4 = -OCH_3$ )、コルムバミン ( $R_1, R_2, R_3, R_4 = -OCH_3$ )、サリフエンジン ( $R_1, R_2 = -OCH_2O-$ 、 $R_3 =$

$-OCH_3$ 、 $R_4 = -OH$ ) 等のイソキノリン系アルカロイドである。本発明ではこれらの中ではベルベリンが好ましい。

本発明では、前記したベルベリンアルカロイド含有物は炭素数2ないし4の脂肪族アルコールで処理されて、原料中に含まれているベルベリンアルカロイドが該脂肪族アルコールに抽出された抽出液が得られる。この場合の脂肪族アルコールとして具体的にはエタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、sec-ブタノール等を挙げることができる。この中ではエタノール、プロパノールが特に好ましい。本発明ではベルベリンアルカロイドの抽出剤として用いられる前記脂肪族アルコールは、単独成分で使用するも良いし、又混合成分として使用するも差し支えない。本発明ではベルベリンアルカロイドの抽出剤としては、前記脂肪族アルコールのみを用いる他に、必要に応じて該アルコールに水を添加した含水アルコールを抽出剤として用いることもでき、この場合の含水率としては通常10重量%以下、好まし

くは5重量%以下である。

本発明ではベルベリンアルカロイドの抽出剤としてはメタノールは使用されない。メタノールを使用した場合には、後述するベルベリンアルカロイドの塩酸塩又は硝酸塩のメタノールに対する溶解度が大きいために、後述するように抽出液に塩交換剤を多量に加えても、又温度を低くしても本発明のようにベルベリンアルカロイドの塩が析出しにくいという欠点がある。そのため前述したように従来のメタノールを抽出剤として用いる方法を採用した場合には、ベルベリンアルカロイドを塩酸塩として析出させるためには、メタノール析出液を濃縮してメタノールの量を少なくしてから水を加えて溶解度を小さくし、次に冷却するという望ましい操作が不可欠であつた。このような従来の方法では操作工程が多いので実用的でなく、しかも該方法によつて析出させたベルベリンアルカロイドの塩には各種の脂肪酸エステル等の不純物が同伴され易いためか、従来法では析出操作に先だつてメタノール抽出物をカラムクロマトにかけ

抽出器に入れ、95%エタノール 140 g で還流下、3 時間連続抽出した。室温下で全抽出液に 3 N-塩酸 18 ml を添加し、3.5 hr 攪拌した。析出した黄色結晶を遠心した後、エタノール次いでヘキサンで洗浄した。得られた粗塩化ベルベリン(純度約 89%)をメタノールから再結晶すると回収率(乾燥カルス中の含有ベルベリン基準)67%で精塩化ベルベリン(純度 99%)を得た。

#### 実施例 2

実施例 1 でエタノールの代りにイソプロパノールを用いて同様に実施して、精塩化ベルベリンを同様に得ることが出来た。

#### 実施例 3 <sup>製</sup>

組織培養法で調製したオーレンの生カルス(ベルベリン含有率 1.00%) 20 g をソックスレー抽出器に入れ、イソプロパノール 50 g で 4 hr、還流抽出を行つた。抽出液を室温まで冷却し、3 N-HCl 100 ml を攪拌下で滴下した。2.0 hr 攪拌

後、析出した黄色結晶を遠心した。黄色結晶をイソプロパノール 5 ml、ついでエーテル 5 ml で洗浄し、ついで乾燥すると 0.26 g (回収率 88%) の粗塩化ベルベリン(純度 88.2%)が得られた。これを実施例 1 と同様の方法で再結晶精製すると、精塩化ベルベリン(純度 99%)を得ることが出来た。

#### 比較例 1

実施例 3 で抽出溶媒にイソプロパノールに代えてメタノールを 40~50 g で抽出すると、3 N-HCl を添加しても塩酸ベルベリンは析出して来なかつた。

#### 実施例 4

実施例 1 においてベルベリンを含有する全抽出液に塩交換剤として塩酸を加える代わりに 3.3 N-硝酸 25 ml を使用した以外は実施例 1 と同様に行つたところ、高純度の硝酸ベルベリンが回収率 64% で得られた。

出願人 生体機能利用化学品新製造技術研究組合  
代理人 山 口 和